昆 虫 学 报 *Acta Entomologica Sinica*，April 2005，48(2)：179 - 183　　ISSN 0454-6296

赤翅甲抗冻蛋白基因的原核表达及蛋白生物活性检测

刘忠渊，张富春*，王　芸，吕国栋

（新疆大学生命科学与技术学院分子生物学重点实验室，新疆生物资源基因工程重点实验室，乌鲁木齐　830046）

摘要：根据 GenBank 中序列人工合成赤翅甲 *Dendroides canadensis* 的抗冻蛋白基因（*afp*），将其克隆到载体 pGEX-4T-1 上，构建融合表达的重组质粒，转化大肠杆菌 BL21 并进行原核表达。通过优化表达的诱导条件和 SDS-PAGE 检测，证明人工合成的赤翅甲抗冻蛋白基因能够特异性地表达，并以可溶性融合蛋白形式存在，相对分子质量约为 40 kD。抗冻蛋白的生物活性检测表明，赤翅甲的抗冻融合蛋白能够提高细菌的耐寒能力。

关键词：赤翅甲；抗冻蛋白；原核表达；抗冻活性

中图分类号：Q966　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2005)02-0179-05

Expression of the antifreeze protein gene of a pyrochroid beetle *Dendroides canadensis* in prokaryote and detection of the protein biological activity

LIU Zhong-Yuan，ZHANG Fu-Chun*，WANG Yun，LU Guo-Dong (Key Laboratory of Molecular Biology，College of Life Science and Technology，Xinjiang Key Laboratory of Biological Resources and Genetic Engineering，Xinjiang University，Urumqi 830046，China)

Abstract：In order to express a pyrochroid beetle *Dendroides canadensis* antifreeze protein in *E. coli* BL21 and to investigate the properties of recombinant antifreeze protein，the *D. canadensis afp* gene was synthesized，cloned into the pGEX-4T-1，and transformed into *E. coli* BL21. The optimal inductive condition was selected by different experimental approaches. The results of SDS-PAGE analysis indicated that the antifreeze protein was expressed successfully in *E. coli* BL21. The expressed antifreeze protein，existing in the soluble and fusion form，with the molecular weight of about 40 kD，could increase low temperature resistance of bacteria as shown by the biological activity detection.

Key words：*Dendroides canadensis*；antifreeze protein；prokaryotic expression；biological activity

抗冻蛋白(antifreeze proteins，AFP)又称为热滞蛋白(thermal hysteresis protein，THP)，是一类能抑制冰晶生长的蛋白质，能在一定程度上降低水溶液的冰点，并具有热滞活性。抗冻蛋白存在于不同生物体中，包括鱼类、昆虫、植物、细菌和真菌，而鱼类抗冻蛋白研究的最多(钟其旺和樊廷俊，2002；景晓红等，2002)。抗冻蛋白可在食品的冷冻、储藏、运输和解冻过程抑制重晶化现象，减少细胞损伤以提高冷冻食品的质量。抗冻蛋白还可用于人类和动物的卵、精子、胚胎或肝脏等器官的超低温保存，改善其冷冻质量。Gabriel 等(2003)首次报道了在老鼠的心脏移植中，用抗冻蛋白低温保藏心脏从而成功地保护了心肌结构。Melanie 等(2002)研究认为，抗冻蛋白具有稳定膜结构和细胞的功能。进一步研究发现，抗冻蛋白用以红细胞的低温保存时，保护效率与它们的热滞活性相关(Chao *et al*.，1996)。另据报道，从黄粉甲 *Tenebrio molitor* 和云杉卷叶蛾 *Choristoneura fumiferana* 等昆虫中分离的抗冻蛋白活性是鱼类抗冻蛋白或抗冻糖蛋白活性的 10 ~ 100 倍(Tyshenko *et al*.，1997；Graham *et al*.，1997)。Andorfer 和 Duman(2000)已从赤翅甲 *Dendroides canadensis* 中克隆到了 13 种抗冻蛋白基因。由于昆虫抗冻蛋白的多样性暗示了这些抗冻蛋白可能由多基因家族控制编码(Andorfer and Duman，2000)，而且这种结构在一定程度上决定了它们产生热滞活性的潜在机制，抗冻性状往往是多个基因共同作用的结果，因而，单独具有较强抗冻性能的昆虫抗冻蛋白将有十分重要的理论研究价值和诱人的应用前景。我

基金项目：国家科技攻关项目(2001BA901A32)

作者简介：刘忠渊，男，1972 年 3 月生，山东人，硕士，讲师，研究方向为分子生物学及基因工程，E-mail：lzy1168@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence，Tel.：86-991-8583259；Fax：86-991-8583259；E-mail：zfc@xju.edu.cn

收稿日期 Received：2004-01-04；接受日期 Accepted：2004-06-29

们在此基础上，根据抗冻蛋白基因分析，利用 GenBank 发表的赤翅甲 *afp* 基因序列合成了甲虫抗冻蛋白基因，以 pGEX-4T-1 为载体构建了融合表达的重组质粒，在大肠杆菌菌株 BL21 中成功地进行了表达，并对表达产物的生物学活性进行了检测。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒：大肠杆菌菌株 BL21 和载体 pGEX-4T-1 为本实验室保藏。

1.1.2 酶及主要试剂：T_4 DNA 连接酶、各种限制性内切核酸酶、DNA 相对分子质量标准物购自 TaKaRa 公司；蛋白质相对分子质量标准物购自华美生物工程公司；谷胱甘肽-琼脂糖树脂为 Pharmacia 生物技术公司产品；其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 抗冻蛋白基因的获得：参照 GenBank 中赤翅甲的 *afp* 基因序列（gi：2737939），由北京 Sunbiotech 公司合成了 327 bp 的 *afp* 基因片段，将 *afp* 克隆到 pMD18-T 载体上，构建了重组质粒 pMD18-T-afp；将阳性克隆送宝生物工程（大连）有限公司进行序列鉴定，以保证 *afp* 基因编码序列的准确性。

1.2.2 原核表达载体 pGEX-4T-1-afp 的构建：质粒的提取、大肠杆菌感受态细胞的制备、连接产物的转化、重组子的筛选及酶切鉴定，均按 Sambrook 等（2001）方法进行。用限制性内切酶 *Eco*RⅠ和 *Sal*Ⅰ酶切大量 pMD18-T-afp，电泳，用回收试剂盒从琼脂糖凝胶上回收 *afp* 基因片段；将质粒 pGEX-4T-1 同样用 *Eco*RⅠ和 *Sal*Ⅰ双酶切，65℃，15 min，酶灭活。用 T_4 DNA 连接酶连接质粒与胶上回收 *afp* 基因片段，对重组子筛选及鉴定后得到 pGEX-4T-1-afp。

1.2.3 诱导条件的优化：为使目的蛋白在表达体系中含量最大，必须对诱导条件进行优化。主要考虑 2 个因素：加入 IPTG 进行诱导时起始菌体的密度和加入 IPTG 的终浓度，而诱导时间（大于 2.5 h）对目的蛋白的含量和产率的影响很小（Burg and Muthing，2000）。为了得到较优的诱导条件，采用起始菌体密度为 0.2、0.4、0.5、0.9、1.0（OD_{600}）共 5 个梯度，IPTG 终浓度为 0.2、0.5、0.8、1.0、1.5 mmol/L 共 5 个梯度，诱导时间均为 4 h，诱导温度为 24℃。经 SDS-PAGE 和光密度扫描检测后，确定合适的起始菌体密度和 IPTG 浓度。

1.2.4 融合蛋白的纯化：由于质粒 pGEX-4T-1 带有谷胱甘肽 S-转移酶基因（GST），所表达的抗冻蛋白与 GST 形成融合蛋白，因此融合蛋白的纯化参照 Pharmacia 生物技术公司的 Glutathione Sepharose 4B 的说明书进行。吸取 1.33 mL 琼脂糖珠悬液，加到 5 mL 离心管中；用 4 mL 冰冷 1 × PBS 缓冲液洗琼脂糖珠，2 000 × g，4℃离心 2 min，重复 3 次。用超声波破碎仪处理已经诱导表达的细菌，取上清液约 5 mL，加入含有琼脂糖珠和 PBS 缓冲液（1～10 μL）的柱子。混匀，4℃放置 1 h 后用 1 × PBS 清洗琼脂糖珠 5 次，加 1 mL 洗脱缓冲液，混匀放置 10～30 min，用 1.5 mL Eppendorf 管收集目的蛋白。

1.2.5 抗冻蛋白生物活性的检测：取新鲜制备的 BL21/pGEX-4T-1 一级菌液，以 1% 的接种比例进行二级培养，37℃过夜培养后，菌液稀释1 000倍，吸取 1 000 μL 分装到 8 个 1.5 mL Eppendorf 管中，其中 6 个 Eppendorf 管中分别加入终浓度为 0、10、30、50、70、90 μg/mL 纯化后的抗冻蛋白（经过滤灭菌，以免纯化后的抗冻蛋白被细菌污染而影响实验结果），然后在 0℃进行冷处理 0 h，24 h，48 h，72 h，96 h，120 h 和 144 h，在经过 0℃处理后，立刻分别吸取 100 μL 菌液在含有氨苄青霉素的 LB 平板上进行涂板，28℃倒置培养 24 h，菌落计数。另外 2 个 Eppendorf 管中分别加入终浓度为 20% 的甘油和 50 μg /mL 的牛血清白蛋白（BSA），在 0℃进行冷处理 0 h，24 h，48 h，72 h，96 h，120 h 和 144 h，吸取 100 μL 菌液在含有氨苄青霉素的 LB 平板上进行涂板，28℃倒置培养 24 h，进行菌落计数。

2 结果与分析

2.1 原核表达载体 pGEX-4T-1-afp 的构建与鉴定

首先用 *Eco*RⅠ和 *Sal*Ⅰ双酶切 pMD18-T-afp，然后将切下的 *afp* 插入到表达载体 pGEX-4T-1 的

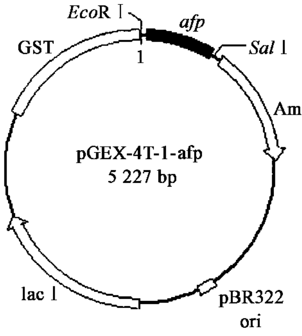

图 1 表达质粒 pGEX-4T-1-afp 的构建图

Fig. 1 Constructure of the expression plasmid pGEX-4T-1-afp

*Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切位点，转化大肠杆菌 BL21，在含有 100 μg/mL 氨卞青霉素的 LB 平板上筛选重组子，获得重组表达质粒 pGEX-4T-1-afp（图 1）。*Eco*R Ⅰ和 *Sal* Ⅰ双酶切鉴定阳性克隆，电泳片段大小与预期的 327 bp 基因片段一致，其中 *afp* 基因与 GST 共阅读框融合，从而形成融合表达载体。

2.2　诱导条件的优化

对诱导条件的起始菌体密度和加入 IPTG 的终浓度进行 SDS-PAGE 分析（图 2）。由于每种组合在加入 IPTG 后均诱导 4 h，确保了 *afp* 能得到最大量的表达。结果显示，随着起始菌体光密度值（OD_{600}）的增大，其诱导表达的蛋白量也逐渐增大，当 OD_{600} 增至 0.50 时，诱导表达的蛋白量增为最大；当 OD_{600} 继续增大时，诱导表达的蛋白量却逐渐减少，至 OD_{600} 为 1.25（预实验结果）时，诱导表达的蛋白量降为最低。对不同的起始菌体密度而言，诱导表达的蛋白量随着 IPTG 的浓度增加而逐渐增加，IPTG 的浓度增至 0.5 mmol/L 时，诱导表达的蛋白量已达最大；当继续增大 IPTG 的浓度时，诱导表达的蛋白量却呈逐渐减少的趋势，这与高浓度 IPTG 对细菌的生长有一定的抑制作用相符合（Burg and Muthing，2000）。当 IPTG 的浓度为 1.0 mmol/L 时，未见蛋白表达。通过实验发现 OD_{600} 为 0.5 时、IPTG 为 0.4，为优化的起始菌体密度和 IPTG 终浓度。随着诱导时间的增加（2.5 h 之内），目的蛋白含量也逐渐增加，当目的蛋白含量增至最大值后（2.5 h 之后）就不再增加。通过以上的分析，优化的诱导条件应为：OD_{600} 为 0.5，IPTG 为 0.4 mmol/L，诱导时间为 2.5 h。

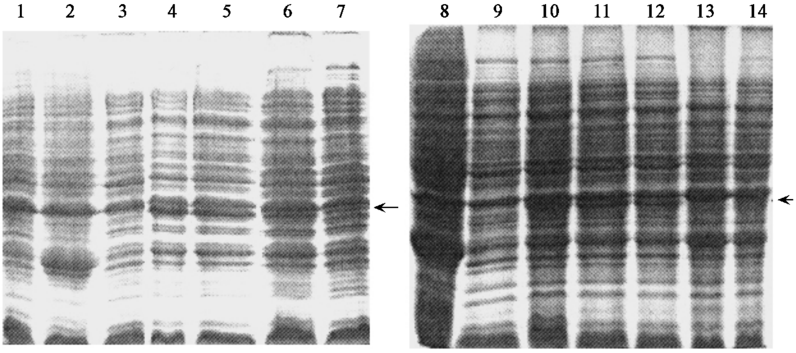

图 2　赤翅甲抗冻蛋白表达诱导条件的优化

Fig. 2　The optimal inductive condition for expression of antifreeze protein

1：pGEX-4T-1 未诱导 Not induced；2：pGEX-4T-1 用 0.5 mmol/L IPTG 诱导 Induced by 0.5 mmol/L IPTG；3：pGEX-4T-1-afp 未诱导 Not induced；4～7：pGEX-4T-1-afp，起始菌体 OD_{600} 分别为 0.2，0.5，0.8，1.0，用 0.5 mmol/L IPTG 诱导 Induced at 0.2，0.5，0.8，1.0 of the starting bacterial OD_{600} by 0.5 mmol/L IPTG，respectively；8：pGEX-4T-1 用 0.5 mmol/L IPTG 诱导 Induced by 0.5 mmol/L IPTG；9：pGEX-4T-1-afp 未诱导 Not induced；10～14：pGEX-4T-1-afp 分别用 0.2，0.4，0.6，0.8，1.0 mmol/L IPTG 诱导 Induced by 0.2，0.4，0.6，0.8，1.0 mmol/L IPTG，respectively.

2.3　表达蛋白的纯化

对所表达的蛋白进行纯化，得到一条抗冻蛋白融合蛋白条带（图 3），纯化蛋白的浓度约为 0.1 μg/mL。

2.4　抗冻蛋白生物活性的检测

在加入终浓度为 0、10、30、50、70、90 μg/mL纯化后的抗冻蛋白，0℃冷处理不同时间，28℃倒置培养 24 h 后，菌落计数结果（3 组重复）见表 1。为了使实验的数据满足方差分析的条件，将实验数据做对数变换（浓度为 0 μg/mL抗冻蛋白的对照组数据除外）后，进行可重复双因素方差分析（表 2）。从方差分析结果可以看出，浓度与时间差异在 α = 0.01 水平上显著，交互作用也显著，因此，甲虫抗冻蛋白提高低温抗性不仅与浓度及时间有关，而且与两者的交互作用也有关。

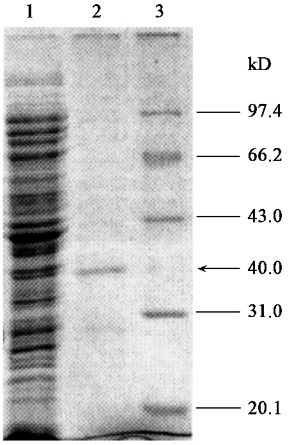

图 3　赤翅甲抗冻蛋白的纯化

Fig. 3　The purification of antifreeze protein

1：pGEX-4T-1-afp 表达总蛋白 Expressed total proteins；2：纯化的蛋白 Purified protein；3：蛋白质相对分子质量标准 Protein marker.

表 1 不同浓度赤翅甲抗冻蛋白处理不同时间的菌落数

Table 1 The bacteria colonies treated with different antifreeze protein concentrations in different times

处理时间(h) Treatment time	**抗冻蛋白浓度** Concentration of antifreeze protein (μg/mL)					
	0	10	30	50	70	90
0	1 131 ± 213	1 135 ± 301	779 ± 243	671 ± 130	788 ± 174	860 ± 62
24	408 ± 160	615 ± 87	573 ± 398	561 ± 85	472 ± 407	507 ± 368
48	0 ± 0	125 ± 67	435 ± 161	910 ± 326	1 900 ± 272	2 074 ± 291
72	0 ± 0	142 ± 26	870 ± 218	2 744 ± 752	2 844 ± 744	2 234 ± 38
96	0 ± 0	246 ± 14	1 791 ± 219	5 612 ± 2 425	6 673 ± 2 096	2 561 ± 683
120	0 ± 0	532 ± 108	3 503 ± 398	10 008 ± 253	10 678 ± 2 808	10 623 ± 1 176
144	0 ± 0	802 ± 147	7 302 ± 1 355	16 467 ± 2 640	31 030 ± 3 548	32 507 ± 8 794

表 2 赤翅甲抗冻蛋白提高细菌低温抗性方差分析

Table 2 The variance analysis of antifreeze protein for improving the low temperature resistance of bacteria

差异来源 Source of variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*F* crit
浓度 Concentration	20.44	6	3.41	162.86^{**}	3.07
时间 Time	12.57	4	3.14	150.17^{**}	3.60
交互作用 Interaction	7.60	24	0.32	15.14^{**}	2.07
误差 Error	1.46	70	0.02		
总计 Total	42.07	104			

** $\alpha = 0.01$.

在对不同浓度的甲虫抗冻蛋白提高细菌低温抗性效果的检测中,从存活菌落数的变化趋势可以看出:细菌在 0℃冷冻处理 24 h 后,对应于不同抗冻蛋白的浓度,其存活菌落数呈下降状态;当 48 h 后,存活菌落数呈上升状态,而且抗冻蛋白的浓度越大,这种趋势越明显。但是对应于没有加抗冻蛋白的对照组,处理 48 h 后,未见有菌落出现。在浓度及时间交互作用中可以看出,随着浓度的升高,时间的延伸,存活的菌落数明显增多。

另外在加入终浓度为 20% 甘油,0℃进行冷处理不同时间,28℃倒置培养 24 h,菌落计数结果是:0 h 为 1 127 ± 117,24 h 为 603 ± 159,48 h 后没有菌落出现。将没有长出菌落的平板放在 37℃培养过夜后又出现了单菌落。加入 50 μg /mL 的 BSA,在 48 h后同样没有菌落出现。

3 讨论

由于对甲虫抗冻蛋白的研究工作还处于起始阶段,因而得到大量纯化的具有天然活性的蛋白对于进一步开展其功能和作用机理的研究是非常重要的。由于融合蛋白易于纯化和进行检测,所以在大肠杆菌中表达外源蛋白时,最常用的方法是采用融合表达的方式(Ford *et al*., 1991),本研究采用融合表达的方式,成功地表达获得了具有活性的抗冻融合蛋白。

在检测不同浓度的甲虫抗冻蛋白提高细菌低温抗性效果中,浓度与时间是交互作用的,即随着浓度的升高,时间的延伸,存活的菌落数明显增多。如在 90 μg/mL 抗冻蛋白浓度的作用下,从 0 h 的 860 个单菌落到 144 h 后的 32 507 个单菌落,菌落数显著增加。可以初步说明细菌在抗冻蛋白的保护下,在 0℃,可能依然在繁殖,证明了原核表达的抗冻蛋白具有强的抗冻保护作用。

实验室常用甘油保存细菌菌种,本研究发现甘油保存的菌种在 0℃冷处理 48 h 后,28℃培养过夜,没有菌落出现,如果将其置于 37℃培养,就会出现单菌落;将抗冻蛋白加入,0℃冷处理时间越长,28℃培养过夜后出现的单菌落越多。这一现象说明抗冻蛋白对细菌具有保护作用,能够促使细菌达到最佳的繁殖状态,也初步表明抗冻蛋白与甘油的作用机制是不同的,其作用机制有待于深入研究。

目前通过抗冻蛋白基因改变动植物抗冻活性的研究,最多使用的是鱼类抗冻蛋白基因,将昆虫抗冻蛋白基因通过基因工程的方法获得大量的抗冻蛋白,利用抗冻蛋白就能获得新的有效抗冻技术和产品。尹明安等(2001)将抗冻蛋白基因整合在 Ti 质粒上,用叶盘法转化郁金香、烟草、油菜等,获得了一定的抗冻力。此后,通过基因工程方法获得了多种抗冻植物。由于昆虫抗冻蛋白的活性明显高于鱼类和植物的抗冻蛋白,其应用前景更广阔。本研究通过原核表达并证实了昆虫抗冻蛋白的活性,为利用昆虫抗冻蛋白基因进行转基因植物和蛋白质工程生产抗冻蛋白产品提供了科学的理论依据。

参考文献(References)

Andorfer CA, Duman JG, 2000. Isolation and characterization of cDNA clones encoding antifreeze proteins of the pyrochroid beetle *Dendroides* *canadensis*. *Journal of Insect Physiology*, 46:365－372.

Burg M, Muthing J, 2000. Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction. *Process Biochemistry*, 9(35):1 019－1 025.

Ford CF, Suominen I, Glatz CE, 1991. Fusion tails for the recovery and purification of recombinant proteins. *Protein Expr*. *Purif*., 2:95－107.

Gabriel A, Boris R, Yigal K, Liana H, Aram KS, Jacob L, 2003. Preservation of myocyte structure and mitochondrial integrity in subzero cryopreservation of mammalian hearts for transplantation using antifreeze proteins: an electron microscopy study. *Eur*. *J*. *Cardiothorac*. *Surg*., 24:292－297.

Graham LA, Liou YC, Walker VK, Davies PL, 1997. Hyperactive antifreeze protein from beetles. *Nature*, 388:727－728.

Chao H, Davies PL, Carpenter JF, 1996. Effects of antifreeze proteins on red blood cell survival during cryopreservation. *The Journal of Experimental Biology*, 199:2 071－2 076.

Jing XH, Hao SG, Kang L, 2002. Cold adaptation in insect: progress in antifreeze protein research. *Acta Entomologica Sinica*, 45(5):679－683.[**景晓红,郝树广,康乐**,2002. **昆虫对低温的适应——抗冻蛋白研究进展**.**昆虫学报**, 45(5):679－683]

Melanie M, Dirk K, Sergio D, Willem F, Lois M, Robert E, Fern T, John H, 2002. A mechanism for stabilization of membranes at low temperatures by an antifreeze protein. *Biophys*. *J*., 82(2):874－881.

Sambrook J, Russell DW, 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Tyshenko MG, Doucet D, Davies PL, Walker VK, 1997. The antifreeze potential of the spruce budworm thermal hysteresis protein. *Nauret*. *Biotechnol*., 15:887－890.

Yin MA, Cui HW, Fan DM, Guo L, 2001. Antifreeze proteins and their application in plant antifreeze genetic engineering. *Acta Bot*. *Boreal*. *Occident*. *Sin*., 21(1):8－13.[**尹明安,崔鸿文,樊代明,郭立**, 2001. **抗冻蛋白及其在植物抗冻基因工程中的应用**. **西北植物学报**,21(1):8－13]

Zhong QW, Fan TJ, 2002. Advances in fish antifreeze protein research. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, 34(2):124－130.[**钟其旺,樊廷俊**,2002. **鱼类抗冻蛋白的研究进展**. **生物化学与生物物理学报**, 34(2):124－130]

(责任编辑:黄玲巧)